

(12) INTERNATIONAL APPLICATION MADE PUBLIC IN ACCORDANCE WITH THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Organization for Intellectual Property  
International Office

(43) International publication date: 1 May 2003 (01.05.2003)

(10) International publication number: WO 03/035869 A1

---

(51) International patent classification7: C12N 15/11, A61K 31/713, C12N 15/88, A61P 35/00

(21) International file number: PCT/EP02/11969

(22) International application date: 25 Oct 2002 (25.10.2002)

(25) Language of submittal: German

(26) Language of publication: German

(30) Priority information:

101 55 280.7 26 Oct 2001 (26.10.2001) DE

101 58 411.3 29 Nov 2001 (29.11.2001) DE

101 60 151.4 7 Dec 2001 (07.12.2001) DE

PCT/EP02/001519 Jan 2002 (09.01.2002) EP

PCT/EP02/001529 Jan 2002 (09.01.2002) EP

102 35 620.3 2 Aug 2002 (02.08.2002) DE

(71) Applicant (for all designated countries except US): RIBOPHARMA AG [DE/DE]; Fritz-Hornschuch-Strasse 9, 95326 Kulmbach (DE).

(72) Inventor; and

(75) Inventor/applicant (only for US): LIMMER, Stefan [DE/DE]; Gutenbergstrasse 9, 95512 Neudrossenfeld (DE). KREUTZER, Roland [DE/DE]; Glotzdorf 26, 95466 Weidenberg (DE). JOHN, Matthias [DE/DE]; Kapellenstrasse 12, 96103 Hallstadt (DE).

(74) Attorney: GASSNER, Wolfgang; Nägelsbachstrasse 49 A, 91052 Erlangen (DE).

(81) Designated countries (unless otherwise indicated, for each available type of national protection): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated countries (unless otherwise indicated, for each available type of regional protection): ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

- with international search report

- prior to expiration of the deadline for changes to the claims; publication will be repeated if changes are made.

For an explanation of the two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" at the start of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: USE OF A DOUBLE-STRANDED RIBONUCLEIC ACID FOR SPECIFICALLY INHIBITING THE EXPRESSION OF A GIVEN TARGET GENE

(57) Abstract: [in English]

**Use of a double-stranded ribonucleic acid for specifically inhibiting the expression of a given target gene.**

The invention concerns the use of a double-stranded ribonucleic acid (dsRNA) for specifically inhibiting the expression of a given target gene, having a point mutation with respect to an original gene, in a cell. Furthermore, it concerns the use of such a ribonucleic acid to produce a medicament, the medicament, and a method for specifically inhibiting the expression of said target gene in a cell.

A method for inhibiting the expression of a target gene in a cell is known from DE 101 00 586 B1, wherein an oligoribonucleotide with double-stranded structure is introduced into the cell. One strand of the double-stranded structure is complementary to the target gene.

It is known from Elbashir, S. M., et al., Nature 411 (2001), pages 494-498, that a short dsRNA in which three nucleotides are not complementary to the target gene hardly inhibits the expression of a target gene at all. A fully complementary dsRNA, on the other hand, produces an effective inhibition of the expression of the target gene.

It is known from Holen, T., et al., Nucleic Acids Research 30 (2002), pages 1757-1766, that an inhibiting of the expression of a gene by short dsRNA through RNA interference is also possible with dsRNAs whose one strand has one or two nucleotides not complementary to the target gene.

Many illnesses and degenerative conditions of cells are due to the fact that a gene important to cells, often a proto-oncogene, is altered by one or a couple of point mutations. The problem in the treatment of such an illness or such cells with the methods known thus far is that the inhibition of the expression of the mutated gene often leads to an inhibition of the nonmutated gene as well. This often results in serious side effects.

The problem of the present invention is to avoid the drawbacks of the prior art. In particular, it should provide for a use of a dsRNA for the specific inhibition of the expression of a target gene having a point mutation with regard to an original gene in a cell so that the expression of the original gene remains largely unaffected. Furthermore, it should provide a medicament and a method for the specific inhibition of the expression of a given target gene, as well as a use for the making of a medicament. This problem is solved by the features of claims 1, 2, 18 and 33. Advantageous embodiments will appear from the features of claims 3 to 17, 19 to 32 and 34 to 44.

According to the invention, there is provided a use of a double-stranded ribonucleic acid (dsRNA) for specifically inhibiting the expression of a given target gene, having a point mutation with respect to an original gene, in a cell, wherein one strand S1 of the dsRNA has a region complementary to the target gene, in which at least one nucleotide is not complementary to the target gene, and the number of nucleotides which are not complementary to the original gene is at least one more than the number of nucleotides which are not complementary to the target gene. The invention moreover concerns the use of such a dsRNA to make a medicament for specifically inhibiting the expression of a given target gene, having a point mutation with respect to an original gene, in a cell. A nucleotide in the sense of this invention is "complementary" to the target gene or original gene if it can form a specific Watson-Crick base pairing with a nucleotide corresponding to it in its sequence position. By "complementary region" is meant that the nucleotides contained therein are basically complementary to the target gene. This means that not all nucleotides in the region are complementary to the target gene. The number of nucleotides which are not complementary to the target gene is one in the lowest case. By target gene is generally meant the DNA strand of the double-stranded DNA present in the cell, which is complementary to a DNA strand serving as the matrix during the transcription, including all transcribed regions. Thus, it generally involves the sense strand. The strand S1 can therefore be complementary to a RNA transcript formed during the expression or its processing product, such as a mRNA. For example, it can be sufficient for the strand S1 to be complementary to a portion of the 3'-untranslated region of the mRNA. But the target gene can also involve a portion of a viral genome. The viral genome can also be the genome of a (+)-strand RNA virus, especially a hepatitis C virus.

The original gene can be any given gene that differs from the target gene being inhibited merely in having one or a few point mutations. In general, it involves a wild type gene. A dsRNA will be produced if the ribonucleic acid consisting of one or two nucleic acid strands has a double-stranded structure. Not all nucleotides of the dsRNA need to have canonical Watson-Crick base pairing within the dsRNA. The maximum possible number of base pairs is the number of nucleotides in the shortest strand contained in the dsRNA. The region complementary to the target gene can have fewer than 25 consecutive nucleotides, in particular 19 to 23, preferably 20 to 24, especially preferably 21 to 23, in particular 22 or 23. The strand S1 can have fewer than 30, preferably fewer than 25, especially preferably 21 to 24, in particular 23 nucleotides. It has been found that short dsRNAs are especially efficient at inhibiting the expression of a target gene. These dsRNAs are also known as siRNAs (short interfering RNAs).

During the specific inhibition, the expression of the original gene is less inhibited than that of the target gene. In the ideal case, the expression of the original gene remains largely unaffected. For this, one specifically uses a dsRNA not optimally inhibiting the expression of the target gene. Thus, one can prepare a dsRNA which is so little complementary to the original gene that its expression remains largely unaffected. Side effects due to inhibiting the original gene can be avoided or mitigated.

The inhibiting of the expression by the dsRNA occurs preferably by the principle of RNA interference. The nucleotide not complementary to the target gene is preferably situated not at the 3' or 5' end of the region. Ideally, the noncomplementary nucleotide lies in the middle part of the region. The target gene can have one or two point mutations with respect to the original gene. In that case, the use for specific inhibiting of the expression of the target gene according to the invention is especially suitable for specifically inhibiting only this expression, but not that of the original gene.

In one embodiment of the invention, the original gene is a proto-oncogene and the target gene an oncogene derived from it. An oncogene often differs from the cellular proto-oncogene corresponding to it by only a single point mutation. The inhibiting of the expression of the oncogene with traditional dsRNA therefore usually also brings about an inhibiting of the expression of the corresponding proto-oncogene. This often entails so serious side effects that a use of traditional dsRNA for inhibiting the target gene in an organism is scarcely possible.

The cell can be a tumor cell. In one embodiment of the invention, one nucleotide of the region is not complementary to the target gene and two nucleotides of the region are not complementary to the original gene. Such a slight difference in the number of complementary nucleotides is already enough to almost totally inhibit the expression of the target gene and leave the expression of the original gene largely unaffected.

In one embodiment of the method, at least one base pair is not complementary within the dsRNA, i.e., the nucleotides of the base pair are not specifically paired according to Watson-Crick. By varying the number of noncomplementary base pairs within the dsRNA, the effectiveness of the dsRNA can be modulated. A reduced complementarity within the dsRNA lessens its stability in the cell.

Preferably, the dsRNA has a single-stranded projection formed from 1 to 4, especially 2 or 3 nucleotides at least at one end of the dsRNA. One end is a region of the dsRNA in which one 5' and one 3' strand end are present. Thus, a dsRNA formed only from the strand S1 has a loop structure and only one end. A dsRNA formed from the strand S1 and a strand S2 has two ends. One end is then formed by one strand end lying on the strand S1 and one lying on the strand S2. Single-stranded projections lessen the stability of the dsRNA in blood, serum and cells and at the same time strengthen the expression-inhibiting action of the dsRNA. It is especially advantageous when the dsRNA has the projection only at one end, especially its end having the 3' end of the strand S1. The other end is then formed smooth in the case of a dsRNA having two ends, i.e., without projections. Surprisingly, it has been found that one projection at one end of the dsRNA is enough to strength the expression-inhibiting action of the dsRNA, without lowering the stability to the same extent as by two projections. A dsRNA with only one projection has proven to be sufficiently durable and especially effective both in various cell culture media and in blood, serum and cells. The inhibiting of the expression is especially effective when the projection is located at the 3' end of the strand S1.

Preferably, the dsRNA has, besides the strand S1, also a strand S2, i.e., it is formed from two single strands. The dsRNA is especially effective when the strand S1 (antisense strand) has a length of 23 nucleotides, the strand S2 a length of 21 nucleotides, and the 3' end of strand S1 a single-stranded projection formed from two nucleotides. The end of the dsRNA located at the 5' end of the strand S1 is formed smooth in this case.

The strand S1 can be complementary to the primary or processed RNA transcript of the target gene. The dsRNA can be present in a preparation that is suitable for inhalation, oral ingestion, infusion and injection, especially for intravenous, intraperitoneal or intratumoral infusion or injection. The preparation can consist, and especially consists solely of a physiologically tolerated solvent, preferably a physiological salt solution or a physiologically tolerated buffer, and the dsRNA. The physiologically tolerated buffer can be a phosphate-buffered salt solution. It has been discovered, surprisingly, that a dsRNA administered and solved simply in such a solvent or such a buffer is taken up by the cell and inhibits the expression of the target gene, without the dsRNA needing to be packaged in a special vehicle for this.

Preferably, the dsRNA is present in a physiologically tolerated solution, especially a physiologically tolerated buffer or a physiological salt solution, or enveloped by a micelle structure, preferably a liposome, a virus capsid, a capsid or a polymer nanocapsule or microcapsule, or bound to a polymer nanocapsule or microcapsule. The physiologically tolerated buffer can be a phosphate-buffered salt solution. A micelle structure, a virus capsid, a capsid or a polymer nanocapsule or microcapsule can facilitate the uptake of the dsRNA into infected cells. The polymer nanocapsule or microcapsule consists of at least one biodegradable polymer, e.g., polybutylcyanoacrylate. The polymer nanocapsule or microcapsule can transport and release in the body the dsRNA contained therein or bound thereto. The dsRNA can be administered orally, by means of inhalation, infusion or injection, especially intravenous, intraperitoneal or intratumoral infusion or injection. Preferably, the dsRNA is used in a dosage of not more than 5 mg, especially not more than 2.5 mg, preferably not more than 200 µg, especially preferably not more than 100 µg, preferably not more than 50 µg, especially not more than 25 µg, per kg of body weight and per day. Namely, it has been found that the dsRNA has an excellent effectiveness in inhibiting the expression of the given target gene already in this dosage.

The invention furthermore concerns a medicament for specifically inhibiting the expression of a given target gene, having a point mutation with respect to an original gene, in a cell, wherein the medicament contains a double-stranded ribonucleic acid (dsRNA), whose one strand S1 has a region complementary to the target gene, in which at least one nucleotide is not complementary to the target gene, and the number of nucleotides which are not complementary to the original gene is at least one more than the number of nucleotides which are not complementary to the target gene. Preferably, the medicament is present in at least one administration unit which contains the dsRNA in an amount that enables a dosage of not more than 5 mg, especially not more than 2.5 mg, preferably not more than 200 µg, especially preferably not more than 100 µg, preferably not more than 50 µg, especially not more than 25 µg, per kg of body weight and per day. The administration unit can be designed for a onetime administration or ingestion per day. In that case, the entire daily dose is contained in one administration unit. If the administration unit is designed for an administration or ingestion several times during the day, the dsRNA is contained in a correspondingly smaller amount, making it possible to achieve the daily dose. The administration unit can also be designed for a single administration or ingestion over several days, by releasing the dsRNA over the course of several days, for example. The administration unit will then contain a corresponding multiple of the daily dose.

According to the invention, furthermore, a method is provided for specifically inhibiting the expression of a given target gene, having a point mutation with respect to an original gene, in a cell, wherein a double-stranded ribonucleic acid (dsRNA) is introduced into the cell and one strand S1 of the dsRNA has a region complementary to the target gene, in which at least one nucleotide is not complementary to the target gene, and the number of nucleotides which are not complementary to the original gene is at least one more than the number of nucleotides which are not complementary to the target gene.

For further advantageous embodiments of the invented medicament and the invented method, refer to the preceding embodiments.

The invention shall now be explained as an example by means of the drawings. These show:

Fig. 1, a graphical representation of the inhibiting of the expression of a HCV-luciferase fusion protein by dsRNAs, which are complementary to a sequence of a target gene in differing degree, and

Fig. 2, a graphical representation of the inhibiting of the expression of a HCV-luciferase fusion protein by dsRNAs, which are complementary to a sequence of a target gene in differing degree and which are partly formed from RNA strands not completely complementary to each other.

In order to make a reporter system, a sequence 26 nucleotides in length of a cDNA sequence, serving as the target gene and corresponding to the 3'-nontranslated region of a HCV-RNA, was fused with the open reading frame of the luciferase gene from the expression vector pGL3. The expression vector pGL3 comes from the Promega company and is registered under the Gene Accession Number U47296 at the National Center for Biotechnology Information (NCBI), National Library of Medicine, Building 38A, Bethesda, MD 20894, USA. The nucleotides 280 to 1932 were used as the luciferase gene. The sequence 26 nucleotides in length is a highly conserved sequence occurring in very many HCV genomes and their subtypes. In the HCV genome registered under the Gene Accession Number D89815 at the NCBI, the 26 nucleotides correspond to the nucleotides 9531 to 9556. They have the following sequence:

5'-gtcacggct agctgtgaa ggtccgt-3' (SEQ ID NO: 1).

The resulting fusion gene was cloned as a BamHI/NotI-DNA fragment in the eukaryotic expression plasmid pcDNA 3.1 (+) from the firm Invitrogen GmbH, Technologiepark Karlsruhe, Emmy-Noether Strasse 10, D-76131 Karlsruhe, catalog No. V790-20. The resulting plasmid is designated p8.

The plasmid pCMVβGal from the firm Clontech, Gene Accession Number U13186, NCBI, was used as a control for the transfection efficiency. This plasmid codes for the enzyme β-galactosidase and brings about its expression.

The plasmid containing the fusion gene, the plasmid serving as the control, and various dsRNAs were introduced jointly by transfection into cells of the liver cell line HuH-7 (JCRB0403, Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank, National Institute of Health Sciences, Kamiyoga 1-18-1, Setagaya-ku, Tokyo 158, Japan). The inhibition of the expression of the luciferase gene caused by the dsRNAs was determined in relation to the expression of the β-galactosidase gene.

The dsRNAs used have the following sequences, designated in the sequence protocol as SEQ ID NO: 2 to SEQ ID NO: 13:

HCV1+2, whose strand S1 is totally complementary to the HCV sequence in the fused HCV-luciferase gene:

S2: 5' - ACG GCU AGC UGU GAA AGG UCC GU-3' (SEQ ID NO: 2)  
S1: 3' - AG UGC CGA UCG ACA CUU UCC AGG - 5' (SEQ ID NO:3)

HCV3+4, which is neither complementary to the HCV nor to the luciferase sequence in the fused HCV-luciferase gene and serves as a negative control:

S2: 5' - AGA CAG UCG ACU UCA GCC U GG-3' (SEQ ID NO: 12)  
S1: 3'-GG UCU GUC AGC UGA AGU CGG A - 5' (SEQ ID NO: 13)

HCV5+6, whose strand S1, apart from the nucleotide printed in bold, is complementary to the HCV sequence in the fused HCV-luciferase gene:

S2: 5' - ACG GCU AGC UGU GAA **UGG** UCC GU-3' (SEQ ID NO: 6)  
S1: 3' - AG UGC CGA UCG ACA CUU **ACC** AGG - 5' (SEQ ID NO:7)

HCV7+8, whose strand S1, apart from the two nucleotides printed in bold, is complementary to the HCV sequence in the fused HCV-luciferase gene:

S2: 5' - ACG GCA AGC UGU GAA **UGG** UCC GU-3' (SEQ ID NO: 8)  
S1: 3' - AG UGC **CGU** UCG ACA CUU **ACC** AGG - 5' (SEQ ID NO:9)

Luc1+2, whose strand S1 is totally complementary to a luciferase sequence in the fused HCV-luciferase gene and which serves as the positive control:

S2: 5' - CGU UAU UUA UCG GAG UUG CAG UU-3' (SEQ ID NO: 10)  
S1: 3' - GC GCA AUA AAU AGC CUC AAC GUC - 5' (SEQ ID NO: 11)

K3s+K3as, which is not complementary to either the HCV or a luciferase sequence in the fused HCV-luciferase gene and serves as the negative control:

S2: 5' - G AUG AGG AUC GUU UCG CAU GA-3' (SEQ ID NO: 4)  
S1: 3'-UCC UAC UCC UAG CAA AGC GUA -5' (SEQ ID NO: 5)

HCV5+2, whose strand S1 is fully complementary to the HCV sequence and whose strand S2, apart from the nucleotide printed in bold, is complementary to the HCV sequence in the fused HCV-luciferase gene:

S2: 5' - ACG GCU AGC UGU GAA **UGG** UCC GU-3' (SEQ ID NO: 6)  
S1: 3' - AG UGC CGA UCG ACA CUU UCC AGG - 5' (SEQ ID NO:3)

HCV1+6, whose strand S2 is fully complementary to the HCV sequence and whose strand S1, apart from the nucleotide printed in bold, is complementary to the HCV sequence in the fused HCV-luciferase gene:

S2: 5' - ACG GCU AGC UGU GAA **AGG** UCC GU-3' (SEQ ID NO: 2)  
S1: 3' - AG UGC CGA UCG ACA CUU **ACC** AGG - 5' (SEQ ID NO:7)

HuH-7 cells were cultured in DMEM with 10% FCS. To prepare for a transfection, 2 x 10E4 cells per well were seeded out in a 96-well cell culture plate. The cells were transfected 24 hours after being seeded by means of 110 µl of transfection medium per each well of the 96-well cell culture plate and continued to be cultured in this entire volume. Each transfection was carried out three times.

For this, at first 3 µg of the plasmid pCMVβGal were mixed with 1 µg of the plasmid p8. The transfection medium contained 0.25 µg of the mixture of plasmids and 200, 100, 50, 25, 12.5 or 0 nmol/l of one of the mentioned dsRNAs per well.

For the transfection, "Gene Porter 2" was used from the company PEQLAB Biotechnologie GmbH, Carl-Thiersch-Str. 2 b, D-91052 Erlangen, catalog number 13-T202007, according to the manufacturer's instructions.

The cells were then incubated at 37 degrees C and 5% CO<sub>2</sub>. One day after the transfection, 35 µl of fresh medium was added to each well and the cells were incubated for a further 24 h.

The effect of the dsRNAs used was determined by quantification of the expressed β-galactosidase by means of "Galacto-Star" from the firm Tropix, 47 Wiggins Avenue, Bedford, MA 01730, USA, catalog number BM100S, and the effect of the expressed luciferase by means of "Luciferase" from the Tropix company, catalog number BC100L, through a chemiluminescence reaction. For this, lysates of the cells were prepared according to the manufacturer's instructions and 2 µl of this per assay was used for the detection of β-galactosidase and 5 µl per assay for the detection of luciferase. The measurement of the chemiluminescence was done in a Sirius luminometer from Berthold Detection Systems GmbH, Bleichstrasse 56-68, D-75173 Pforzheim, Germany. The relative activity of the luciferase is determined as a measure of the expression, dividing the chemiluminescence value determined for luciferase by the value determined for β-galactosidase. For every 3 values so determined, a mean is calculated. The mean for cells transfected

without dsRNA is arbitrarily defined as 1.0. The other means are placed in relation to this and shown by graph in Fig. 1 and 2.

Luc1+2 (positive control) resulted in the strongest inhibition of the luciferase activity (Fig. 1 and 2). In presence of HCV1+2, which was totally complementary to the target sequence for the reporter plasmid, a considerable reduction of the luciferase activity is likewise noticeable (Fig. 1 and 2). With decreasing concentration of HCV1+2, the luciferase activity increased. The oligonucleotide HCV5+6 not complementary to the target sequence in a nucleotide is similar to HCV1+2 in efficiency of luciferase inhibition, especially at low concentrations (Fig. 1). For the specificity of this dsRNA, this means that it is not enough for the dsRNA to be complementary to the target gene, yet it is not complementary to the original gene by one nucleotide, in order to inhibit the expression of the target gene specifically with respect to the expression of the original gene.

HCV7+8 inhibits the expression of luciferase both in high and also in low concentrations only to the degree of the negative controls HCV3+4 and K3S+K3AS (Fig. 1 and 2). The slight inhibition of the luciferase activity is to be deemed a nonspecific effect. For the specificity of this dsRNA, this means that it is enough for the dsRNA to be complementary to the target gene or not complementary by only one nucleotide, yet not complementary to the original gene in two nucleotides, in order to inhibit the expression of the target gene specifically with respect to the expression of the original gene.

In HCV5+2, one nucleotide in the sense strand S2 is not complementary to the antisense strand S1, while the antisense strand S1 is fully complementary to the target gene. This dsRNA is as efficient as LUC1+2 and HCV1+2 (Fig. 1 and 2). This is surprising, since a complementarity reduced by one base pair within the dsRNA would suggest a lower stability of the dsRNA in the cell and therefore a lower efficiency.

In HCV6+1, one nucleotide in the antisense strand S1 is not complementary to the sense strand S2, while the antisense strand S1 is also not complementary to the target gene by one nucleotide. HCV6+1 inhibits the expression less efficiently than HCV5+6, but more efficiently than HCV7+8 (Fig. 2). Thus, for the specificity and efficiency of the expression-inhibiting effect of the dsRNA, the sequence of the antisense strand S1 is more important than that of the sense strand S2.

HCV3+4 (Fig. 1) and K3S+K3AS (Fig. 2), serving as the negative control, resulted in little or no inhibition of the luciferase activity. The slight inhibition is nonspecific, since it does not depend on the concentration of the dsRNAs used.

The data show that at least two nucleotides not complementary to an original gene in the antisense strand of a dsRNA are needed to prevent an inhibition of the expression of the original gene. Furthermore, the data show that a modulation of the effectiveness of the inhibition of the expression by a dsRNA is possible by decreasing the degree of complementarity of the single strands forming the dsRNA.

## Patent claims

1. Use of a double-stranded ribonucleic acid (dsRNA) for specifically inhibiting the expression of a given target gene, having a point mutation with respect to an original gene, in a cell, wherein one strand S1 of the dsRNA has a region complementary to the target gene, in which at least one nucleotide is not complementary to the target gene, and the number of nucleotides which are not complementary to the original gene is at least one more than the number of nucleotides which are not complementary to the target gene.
2. Use of a double-stranded ribonucleic acid (dsRNA) to make a medicament for specifically inhibiting the expression of a given target gene, having a point mutation with respect to an original gene, in a cell, wherein one strand S1 of the dsRNA has a region complementary to the target gene, in which at least one nucleotide is not complementary to the target gene, and the number of nucleotides which are not complementary to the original gene is at least one more than the number of nucleotides which are not complementary to the target gene.
3. Use per claim 1 or 2, wherein the nucleotide not complementary to the target gene is not situated at the 3' or 5' end of the region.
4. Use per one of the preceding claims, wherein the target gene has one or two point mutations with respect to the original gene.
5. Use per one of the preceding claims, wherein the original gene is a proto-oncogene and the target gene an oncogene derived from it.
6. Use per one of the preceding claims, wherein the cell is a tumor cell.
7. Use per one of the preceding claims, wherein one nucleotide of the region is not complementary to the target gene and two nucleotides of the region are not complementary to the original gene.
8. Use per one of the preceding claims, wherein at least one base pair is not complementary within the dsRNA.
9. Use per one of the preceding claims, wherein the dsRNA has a single-stranded projection formed from 1 to 4, especially 2 or 3 nucleotides at least at one end of the dsRNA.
10. Use per claim 9, wherein the dsRNA has the projection only at one end, especially its end having the 3' end of the strand S1.
11. Use per one of the preceding claims, wherein the dsRNA has, besides the strand S1, also a strand S2, and the strand S1 has a length of 23 nucleotides, the strand S2 a length of 21 nucleotides, and the 3' end of strand S1 a single-stranded projection formed from two nucleotides, while the end of the dsRNA located at the 5' end of the strand S1 is formed smooth in this case.
12. Use per one of the preceding claims, wherein the strand S1 is complementary to the primary or processed RNA transcript of the target gene.
13. Use per one of the preceding claims, wherein the dsRNA is present in a preparation that is suitable for inhalation, oral ingestion, infusion and injection, especially for intravenous, intraperitoneal or intratumoral infusion or injection.
14. Use per claim 13, wherein the preparation consists, and especially consists solely of a physiologically tolerated solvent, preferably a physiological salt solution or a physiologically tolerated buffer, especially a phosphate-buffered salt solution, and the dsRNA.

15. Use per one of the preceding claims, wherein the dsRNA is present in a physiologically tolerated solution, especially a physiologically tolerated buffer or a physiological salt solution, or enveloped by a micelle structure, preferably a liposome, a virus capsid, a capsid or a polymer nanocapsule or microcapsule, or bound to a polymer nanocapsule or microcapsule.
16. Use per one of the preceding claims, wherein the dsRNA is administered orally, by means of inhalation, infusion or injection, especially intravenous, intraperitoneal or intratumoral infusion or injection.
17. Use per one of the preceding claims, wherein the dsRNA is used in a dosage of not more than 5 mg, especially not more than 2.5 mg, preferably not more than 200 µg, especially preferably not more than 100 µg, preferably not more than 50 µg, especially not more than 25 µg, per kg of body weight and per day.
18. Medicament for specifically inhibiting the expression of a given target gene, having a point mutation with respect to an original gene, in a cell, wherein the medicament contains a double-stranded ribonucleic acid (dsRNA), whose one strand S1 has a region complementary to the target gene, in which at least one nucleotide is not complementary to the target gene, and the number of nucleotides which are not complementary to the original gene is at least one more than the number of nucleotides which are not complementary to the target gene.
19. Medicament per claim 18, wherein the nucleotide not complementary to the target gene is not situated at the 3' or 5' end of the region.
20. Medicament per claims 18 or 19 wherein the target gene has one or two point mutations with respect to the original gene.
21. Medicament per one of claims 18 to 20, wherein the original gene is a proto-oncogene and the target gene an oncogene derived from it.
22. Medicament per one of claims 18 to 21, wherein the cell is a tumor cell.
23. Medicament per one of claims 18 to 22, wherein one nucleotide of the region is not complementary to the target gene and two nucleotides of the region are not complementary to the original gene.
24. Medicament per one of claims 18 to 23, wherein at least one base pair is not complementary within the dsRNA.
25. Medicament per one of claims 18 to 24, wherein the dsRNA has a single-stranded projection formed from 1 to 4, especially 2 or 3 nucleotides at least at one end of the dsRNA.
26. Medicament per claim 25, wherein the dsRNA has the projection only at one end, especially its end having the 3' end of the strand S1.
27. Medicament per claim 26, wherein the dsRNA has, besides the strand S1, also a strand S2, and the strand S1 has a length of 23 nucleotides, the strand S2 a length of 21 nucleotides, and the 3' end of strand S1 a single-stranded projection formed from two nucleotides, while the end of the dsRNA located at the 5' end of the strand S1 is formed smooth in this case.
28. Medicament per one of claims 18 to 27, wherein the strand S1 is complementary to the primary or processed RNA transcript of the target gene.
29. Medicament per one of claims 18 to 28, wherein the dsRNA is present in a preparation that is suitable for inhalation, oral ingestion, infusion and injection, especially for intravenous, intraperitoneal or intratumoral infusion or injection.

30. Medicament per claim 29, wherein the preparation consists, and especially consists solely of a physiologically tolerated solvent, preferably a physiological salt solution or a physiologically tolerated buffer, especially a phosphate-buffered salt solution, and the dsRNA.

31. Medicament per one of claims 18 to 30, wherein the dsRNA in the medicament is present in a solution, especially a physiologically tolerated buffer or a physiological salt solution, or enveloped by a micelle structure, preferably a liposome, a virus capsid, a capsid or a polymer nanocapsule or microcapsule, or bound to a polymer nanocapsule or microcapsule.

32. Medicament per one of claims 18 to 31, wherein the medicament is present in at least one administration unit which contains the dsRNA in an amount that enables a dosage of not more than 5 mg, especially not more than 2.5 mg, preferably not more than 200 µg, especially preferably not more than 100 µg, preferably not more than 50 µg, especially not more than 25 µg, per kg of body weight and per day.

33. Method for specifically inhibiting the expression of a given target gene, having a point mutation with respect to an original gene, in a cell, wherein a double-stranded ribonucleic acid (dsRNA) is introduced into the cell and one strand S1 of the dsRNA has a region complementary to the target gene, in which at least one nucleotide is not complementary to the target gene, and the number of nucleotides which are not complementary to the original gene is at least one more than the number of nucleotides which are not complementary to the target gene.

34. Method per claim 33, wherein the nucleotide not complementary to the target gene is not situated at the 3' or 5' end of the region.

35. Method per claim 33 or 34, wherein the target gene has one or two point mutations with respect to the original gene.

36. Method per one of claims 33 to 35, wherein the original gene is a proto-oncogene and the target gene an oncogene derived from it.

37. Method per one of claims 33 to 36, wherein the cell is a tumor cell.

38. Method per one of claims 33 to 37, wherein one nucleotide of the region is not complementary to the target gene and two nucleotides of the region are not complementary to the original gene.

39. Method per one of claims 33 to 38, wherein at least one base pair is not complementary within the dsRNA.

40. Method per one of claims 33 to 39, wherein the dsRNA has a single-stranded projection formed from 1 to 4, especially 2 or 3 nucleotides at least at one end of the dsRNA.

41. Method per claim 40, wherein the dsRNA has the projection only at one end, especially its end having the 3' end of the strand S1.

42. Method per claim 41, wherein the dsRNA has, besides the strand S1, also a strand S2, and the strand S1 has a length of 23 nucleotides, the strand S2 a length of 21 nucleotides, and the 3' end of strand S1 a single-stranded projection formed from two nucleotides, while the end of the dsRNA located at the 5' end of the strand S1 is formed smooth.

43. Method per one of claims 33 to 42, wherein the strand S1 is complementary to the primary or processed RNA transcript of the target gene.

44. Method per one of claims 33 to 43, wherein the dsRNA is present in a solution, especially a physiologically tolerated buffer or a physiological salt solution, or enveloped by a micelle structure, preferably a liposome, a virus capsid, a capsid or a polymer nanocapsule or microcapsule, or bound to a polymer nanocapsule or microcapsule.

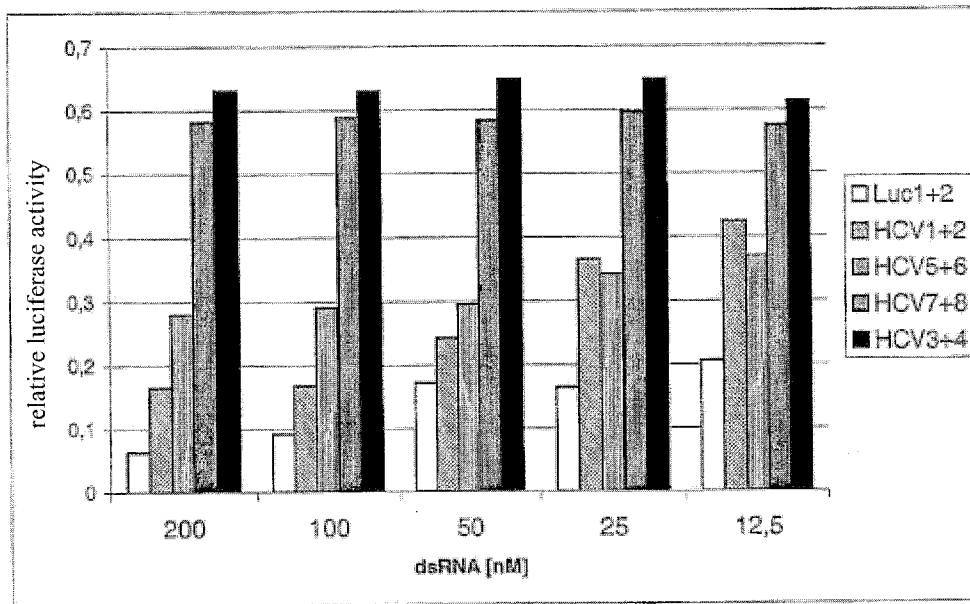


Fig. 1

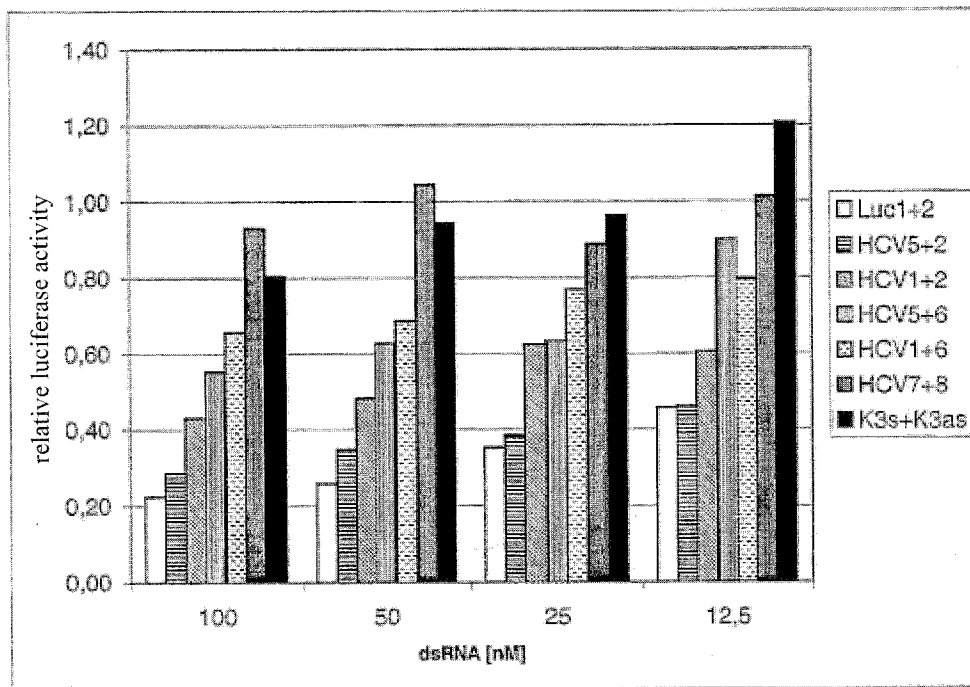


Fig. 2

## SEQUENCE PROTOCOL

<110> Ribopharma AG

<120> Use of a double-stranded ribonucleic acid for specifically inhibiting the expression of a given target gene

<130> 422290EH

<140>

<141>

<160> 13

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 26

<212> DNA

<213> Hepatitis C virus

<400> 1

gtcacggcta gctgtgaaag gtcagt

26

<210> 2

<211> 23

<212> RNA

<213> Hepatitis C virus

<400> 2

acggcuagcu gugaaagguc cgu

23

<210> 3

<211> 23

<212> RNA

<213> Hepatitis C virus

<400> 3

ggaccuuuca cagcuagcag uga

23

<210> 4

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description of the artificial sequence: sense strand of a dsRNA complementary to a sequence of the Neomycin resistance gene

<400> 4

gaugaggaua guuucgcaug a

21

<210> 5

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description of the artificial sequence: antisense strand of a dsRNA complementary to a sequence of the Neomycin resistance gene

<400> 5  
augcgaaacy auccucaucc u 21

<210> 6  
<211> 23  
<212> RNA  
<213> Hepatitis C virus

<400> 6  
acggcuagcu gugaauagguc cgu 23

<210> 7  
<211> 23  
<212> RNA  
<213> Hepatitis C virus

<400> 7  
ggaccauua cagcuagccg uga 23

<210> 8  
<211> 23  
<212> RNA  
<213> Hepatitis C virus

<400> 8  
acggcaagcu gugaauagguc cgu 23

<210> 9  
<211> 23  
<212> RNA  
<213> Hepatitis C virus

<400> 9  
ggaccauua cagcuagccg uga 23

<210> 10  
<211> 23  
<212> RNA  
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description of the artificial sequence: sense strand of a dsRNA complementary to a sequence of the luciferase gene

<400> 10  
cguaauuuau cggaguugca guu 23

<210> 11  
<211> 23  
<212> RNA  
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description of the artificial sequence: antisense strand of a dsRNA complementary to a sequence of the luciferase gene

<400> 11	
cugcaatucc gaaaaauaac gcg	23
<210> 12	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Hepatitis C virus	
<400> 12	
agacaguuga cuucagccug g	21
<210> 13	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Hepatitis C virus	
<400> 13	
aggcugaagu cgacugucug g	21

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
1. Mai 2003 (01.05.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 03/035869 A1**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: **C12N 15/11**, (74) Anwalt: GASSNER, Wolfgang; Nägelsbachstrasse 49 A,  
A61K 31/713, C12N 15/88, A61P 35/00 91052 Erlangen (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/11969

(22) Internationales Anmeldedatum:  
25. Oktober 2002 (25.10.2002)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
101 55 280.7 26. Oktober 2001 (26.10.2001) DE  
101 58 411.3 29. November 2001 (29.11.2001) DE  
101 60 151.4 7. Dezember 2001 (07.12.2001) DE  
PCT/EP02/00151 9. Januar 2002 (09.01.2002) EP  
PCT/EP02/00152 9. Januar 2002 (09.01.2002) EP  
102 35 620.3 2. August 2002 (02.08.2002) DE

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): RIBOPHARMA AG [DE/DE]; Fritz-Hornschuch-Strasse 9, 95326 Kulmbach (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): LIMMER, Stefan [DE/DE]; Gutenbergstrasse 9, 95512 Neudrossenfeld (DE). KREUTZER, Roland [DE/DE]; Glotzdorf 26, 95466 Weidenberg (DE). JOHN, Matthias [DE/DE]; Kapellenstrasse 12, 96103 Hallstadt (DE).

**Veröffentlicht:**

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: USE OF A DOUBLE-STRANDED RIBONUCLEIC ACID FOR SPECIFICALLY INHIBITING THE EXPRESSION OF A GIVEN TARGET GENE

(54) Bezeichnung: VERWENDUNG EINER DOPPELSTRÄNGIGEN RIBONUKLEINSÄURE ZUR GEZIELTEN HEMMUNG DER EXPRESSION EINES VORGEGEBENEN ZIELGENS

(57) Abstract: The invention relates to the use of a double-stranded ribonucleic acid (dsRNA) for specifically inhibiting the expression in a cell of a given target gene that has a point mutation as compared to an original gene. A strand S1 of said dsRNA has a region that is complementary to the target gene in which at least one nucleotide is not complementary to the target gene and at least one nucleotide more is not complementary to the original gene than is not complementary to the target gene.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft eine Verwendung einer doppelsträngigen Ribonukleinsäure (dsRNA) zur gezielten Hemmung der Expression eines vorgegebenen, gegenüber einem Ursprungsgen punktmutierten Zielgens in einer Zelle, wobei ein Strang S1 der dsRNA einem zum Zielgen komplementären Bereich aufweist, in welchem mindestens ein Nukleotid nicht komplementär zum Zielgen und mindestens ein Nukleotid mehr als zum Zielgen nicht komplementär zum Ursprungsgen ist.



WO 03/035869 A1

**Verwendung einer doppelsträngigen Ribonukleinsäure zur gezielten Hemmung der Expression eines vorgegebenen Zielgens.**

Die Erfindung betrifft die Verwendung einer doppelsträngigen  
5 Ribonukleinsäure (dsRNA) zur gezielten Hemmung der Expression  
eines vorgegebenen, gegenüber einem Ursprungsgen punktmutier-  
ten Zielgens in einer Zelle. Sie betrifft weiterhin die Ver-  
wendung einer solchen Ribonukleinsäure zur Herstellung eines  
Medikaments, ein Medikament und ein Verfahren zur gezielten  
10 Hemmung der Expression des genannten Zielgens in einer Zelle.

Aus der DE 101 00 586 C1 ist ein Verfahren zur Hemmung der  
Expression eines Zielgens in einer Zelle bekannt, bei dem ein  
Oligoribonukleotid mit doppelsträngiger Struktur in die Zelle  
15 eingeführt wird. Ein Strang der doppelsträngigen Struktur ist  
dabei komplementär zum Zielgen.

Aus Elbashir, S. M. et al., Nature 411 (2001), Seiten 494 -  
498 ist es bekannt, dass eine kurze dsRNA, in welcher drei  
20 Nukleotide nicht komplementär zum Zielgen sind, die Expressi-  
on eines Zielgens kaum noch hemmt. Eine vollständig komple-  
mentäre dsRNA bewirkt dagegen eine effektive Hemmung der Ex-  
pression des Zielgens.

25 Aus Hoken, T. et al., Nucleic Acids Research 30 (2002), Sei-  
ten 1757 - 1766, ist es bekannt, dass eine Hemmung der Ex-  
pression eines Gens durch kurze dsRNA im Wege der RNA-  
Interferenz auch mit dsRNAs möglich ist, deren einer Strang  
ein oder zwei zum Zielgen nicht komplementäre Nukleotide auf-  
30 weist.

Viele Krankheiten und Entartungen von Zellen beruhen darauf,  
dass ein für Zellen wichtiges Gen, häufig ein Proto-Onkogen,  
durch eine oder wenige Punktmutationen verändert ist. Das  
35 Problem bei der Behandlung einer solchen Krankheit oder sol-

cher Zellen mit den bisher bekannten Methoden besteht darin, dass die Inhibition der Expression des mutierten Gens häufig ebenfalls zu einer Inhibition des nicht mutierten Gens führt. Dies hat oft gravierende Nebenwirkungen zur Folge.

5

Aufgabe der vorliegende Erfindung ist es, die Nachteile nach dem Stand der Technik zu vermeiden. Insbesondere soll eine Verwendung einer dsRNA zur gezielten Hemmung der Expression eines gegenüber einem Ursprungsgen punktmutierten Zielgens in einer Zelle bereitgestellt werden, bei der die Expression des Ursprungsgens weitgehend unbeeinflusst bleibt. Weiterhin soll ein Medikament und ein Verfahren zur gezielten Hemmung der Expression eines vorgegebenen Zielgens sowie eine Verwendung zur Herstellung des Medikaments bereitgestellt werden. Diese Aufgabe wird durch die Merkmale der Ansprüche 1, 2, 18 und 33 gelöst. Vorteilhafte Ausgestaltungen ergeben sich aus den Merkmalen der Ansprüche 3 bis 17, 19 bis 32 und 34 bis 44.

Erfindungsgemäß ist eine Verwendung einer doppelsträngigen Ribonukleinsäure (dsRNA) zur gezielten Hemmung der Expression eines vorgegebenen, gegenüber einem Ursprungsgen punktmutierten Zielgens in einer Zelle vorgesehen, wobei ein Strang S1 der dsRNA einen zum Zielgen komplementären Bereich aufweist, in welchem mindestens ein Nukleotid nicht komplementär zum Zielgen ist und die Anzahl der Nukleotide, welche nicht komplementär zum Ursprungsgen sind, um mindestens eins höher ist als die Anzahl der Nukleotide, welche nicht komplementär zum Zielgen sind. Die Erfindung betrifft weiterhin die Verwendung einer solchen dsRNA zur Herstellung eines Medikaments zur gezielten Hemmung der Expression eines vorgegebenen, gegenüber einem Ursprungsgen punktmutierten Zielgens in einer Zelle. Ein Nukleotid ist im Sinne dieser Erfindung "komplementär" zum Zielgen oder Ursprungsgen, wenn es mit einem ihm darin in seiner Sequenzposition entsprechenden Nukleotid eine spezifische Watson-Crick-Basenpaarung ausbilden kann. Unter dem

"komplementären Bereich" wird verstanden, dass die darin enthaltenen Nukleotide im Wesentlichen komplementär zum Zielgen sind. Das bedeutet, dass nicht alle Nukleotide in dem Bereich komplementär zum Zielgen sind. Die Anzahl der Nukleotide, welche nicht komplementär zum Zielgen sind, ist im niedrigsten Fall eins. Unter dem Zielgen wird im Allgemeinen der DNA-Strang der doppelsträngigen in der Zelle vorhandenen DNA verstanden, welcher komplementär zu einem bei der Transkription als Matrizie dienenden DNA-Strang einschließlich aller transkribierten Bereiche ist. Es handelt sich dabei also im Allgemeinen um den Sinn-Strang. Der Strang S1 kann somit komplementär zu einem bei der Expression gebildeten RNA-Transkript oder dessen Prozessierungsprodukt, wie z.B. einer mRNA, sein. Es kann z.B. ausreichend sein, wenn der Strang S1 komplementär zu einem Teil des 3'-untranslatierten Bereichs der mRNA ist. Bei dem Zielgen kann es sich aber auch um einen Teil eines viralen Genoms handeln. Das virale Genom kann auch das Genom eines (+)-Strang-RNA-Virus, insbesondere eines Hepatitis C-Virus, sein.

Das Ursprungsgen kann jedes beliebige Gen sein, welches von dem zu hemmenden Zielgen nur durch eine oder wenige Punktmutationen abweicht. Im Allgemeinen handelt es sich dabei um ein Wildtyp-Gen. Eine dsRNA liegt vor, wenn die aus einem oder zwei Nukleinsäure-Strängen bestehende Ribonukleinsäure eine doppelsträngige Struktur aufweist. Nicht alle Nukleotide der dsRNA müssen innerhalb der dsRNA kanonische Watson-Crick-Basenpaarung aufweisen. Die maximal mögliche Zahl der Basenpaare ist die Zahl der Nukleotide in dem kürzesten in der dsRNA enthaltenden Strang. Der zum Zielgen komplementäre Bereich kann weniger als 25 aufeinander folgende Nukleotide, insbesondere 19 bis 24, bevorzugt 20 bis 24, besonders bevorzugt 21 bis 23, insbesondere 22 oder 23, Nukleotide aufweisen. Der Strang S1 kann weniger als 30, vorzugsweise weniger als 25, besonders vorzugsweise 21 bis 24, insbesondere 23,

Nukleotide aufweisen. Es hat sich gezeigt, dass kurze dsRNAs besonders effizient in der Hemmung der Expression eines Zielgens sind. Diese dsRNAs werden auch als siRNAs (short interfering RNAs) bezeichnet.

5

Bei der gezielten Hemmung wird die Expression des Ursprungsgens weniger inhibiert als diejenige des Zielgens. Im Idealfall bleibt die Expression des Ursprungsgens weit gehend unbeeinflusst. Dazu wird gezielt eine die Expression des Zielgens nicht optimal hemmende dsRNA verwendet. So kann eine dsRNA bereitgestellt werden, welche zum Ursprungsgen so wenig komplementär ist, dass dessen Expression weit gehend unbeeinflusst bleibt. Nebenwirkungen durch Hemmung des Ursprungsgens können vermieden oder verringert werden.

15

Die Hemmung der Expression durch die dsRNA erfolgt vorzugsweise nach dem Prinzip der RNA-Interferenz. Das zum Zielgen nicht komplementäre Nukleotid ist bevorzugt nicht am 3'- oder am 5'-Ende des Bereichs gelegen. Idealerweise liegt das nicht komplementäre Nukleotid im mittleren Teil des Bereichs. Das Zielgen kann gegenüber dem Ursprungsgen eine oder zwei Punktmutationen aufweisen. Dann ist die erfindungsgemäße Verwendung zur gezielten Hemmung der Expression des Zielgens besonders geeignet, gezielt nur diese Expression, nicht aber diejenige des Ursprungsgens zu hemmen.

25

Bei einer Ausgestaltung der Erfindung ist das Ursprungsgen ein Proto-Onkogen und das Zielgen ein davon abgeleitetes Onkogen. Ein Onkogen unterscheidet sich häufig von dem ihm entsprechenden zellulären Proto-Onkogen nur durch eine einzige Punktmutation. Die Hemmung der Expression des Onkogens mit herkömmlicher dsRNA bewirkt daher üblicherweise auch eine Hemmung der Expression des entsprechenden Proto-Onkogens. Das ist häufig mit so schwer wiegenden Nebenwirkungen verbunden,

30

dass eine Verwendung herkömmlicher dsRNA zur Hemmung des Zielgens in einem Organismus kaum möglich ist.

Die Zelle kann dabei eine Tumorzelle sein. Bei einer Ausgestaltung der Erfindung ist ein Nukleotid des Bereichs nicht komplementär zum Zielgen und zwei Nukleotide des Bereichs sind nicht komplementär zum Ursprungsgen. Bereits ein derart geringer Unterschied in der Zahl komplementärer Nukleotide kann ausreichen, um die Expression des Zielgens nahezu vollständig zu hemmen und die Expression des Ursprungsgens weitgehend unbeeinflusst zu lassen.

In einer Ausgestaltung des Verfahrens ist innerhalb der dsRNA mindestens ein Basenpaar nicht komplementär, d.h. die Nukleotide des Basenpaars sind nicht spezifisch nach Watson-Crick gepaart. Durch die Variation der Zahl der nicht komplementären Basenpaare innerhalb der dsRNA kann die Wirksamkeit der dsRNA moduliert werden. Eine reduzierte Komplementarität innerhalb der dsRNA verringert deren Stabilität in der Zelle.

Vorzugsweise weist die dsRNA zumindest an einem Ende der dsRNA einen aus 1 bis 4, insbesondere 2 oder 3, Nukleotiden gebildeten einzelsträngigen Überhang auf. Ein Ende ist dabei ein Bereich der dsRNA, in welchem ein 5'- und ein 3'-Strangende vorliegen. Eine nur aus dem Strang S1 bestehende dsRNA weist demnach eine Schleifenstruktur und nur ein Ende auf. Eine aus dem Strang S1 und einem Strang S2 gebildete dsRNA weist zwei Enden auf. Ein Ende wird dann jeweils von einem auf dem Strang S1 und einem auf dem Strang S2 liegenden Strangende gebildet. Einzelsträngige Überhänge verringern die Stabilität der dsRNA in Blut, Serum und Zellen und verstärken gleichzeitig die expressionshemmende Wirkung der dsRNA. Besonders vorteilhaft ist es, wenn die dsRNA den Überhang ausschließlich an einem, insbesondere ihrem das 3'-Ende des Strangs S1 aufweisenden, Ende aufweist. Das andere Ende ist

dann bei einer zwei Enden aufweisenden dsRNA glatt, d.h. ohne Überhänge, ausgebildet. Überraschenderweise hat es sich gezeigt, dass zur Verstärkung der expressionshemmenden Wirkung der dsRNA ein Überhang an einem Ende der dsRNA ausreichend  
5 ist, ohne dabei die Stabilität in einem solchen Maße zu erniedrigen wie durch zwei Überhänge. Eine dsRNA mit nur einem Überhang hat sich sowohl in verschiedenen Zellkulturmedien als auch in Blut, Serum und Zellen als hinreichend beständig und besonders wirksam erwiesen. Die Hemmung der Expression  
10 ist besonders effektiv, wenn sich der Überhang am 3'-Ende des Strangs S1 befindet.

Vorzugsweise weist die dsRNA neben dem Strang S1 einen Strang S2 auf, d.h. sie ist aus zwei Einzelsträngen gebildet. Besonders wirksam ist die dsRNA, wenn der Strang S1 (Antisinn-  
15 Strang) eine Länge von 23 Nukleotiden, der Strang S2 eine Länge von 21 Nukleotiden und das 3'-Ende des Strangs S1 einen aus zwei Nukleotiden gebildeten einzelsträngigen Überhang aufweist. Das am 5'-Ende des Strangs S1 gelegene Ende der  
20 dsRNA ist dabei glatt ausgebildet.

Der Strang S1 kann zum primären oder prozessierten RNA-Transkript des Zielgens komplementär sein. Die dsRNA kann in einer Zubereitung vorliegen, die zur Inhalation, oralen Aufnahme, Infusion und Injektion, insbesondere zur intravenösen,  
25 intraperitonealen oder intratumoralen Infusion oder Injektion, geeignet ist. Die Zubereitung kann dabei, insbesondere ausschließlich, aus einem physiologisch verträglichen Lösungsmittel, vorzugsweise einer physiologischen Kochsalzlösung oder einem physiologisch verträglichen Puffer, und der  
30 dsRNA bestehen. Der physiologisch verträgliche Puffer kann eine phosphatgepufferte Salzlösung sein.. Es hat sich nämlich überraschenderweise herausgestellt, dass eine lediglich in einem solchen Lösungsmittel oder einem solchen Puffer gelöste  
35 und verabreichte dsRNA von der Zelle aufgenommen wird und die

Expression des Zielgens hemmt, ohne dass die dsRNA dazu in einem besonderen Vehikel verpackt sein muss.

Vorzugsweise liegt die dsRNA in einer physiologisch verträglichen Lösung, insbesondere einem physiologisch verträglichen Puffer oder einer physiologischen Kochsalzlösung, oder von einer micellaren Struktur, vorzugsweise einem Liposom, einem Virus-Kapsid, einem Kapsoid oder einer polymeren Nano- oder Mikrokapsel umschlossen oder an einer polymeren Nano- oder Mikrokapsel gebunden vor. Der physiologisch verträgliche Puffer kann eine phosphatgepufferte Salzlösung sein. Eine micellare Struktur, ein Virus-Kapsid, ein Kapsoid oder eine polymere Nano- oder Mikrokapsel kann die Aufnahme der dsRNA in infizierte Zellen erleichtern. Die polymere Nano- oder Mikrokapsel besteht aus mindestens einem biologisch abbaubaren Polymer, z.B. Polybutylcyanoacrylat. Die polymere Nano- oder Mikrokapsel kann darin enthaltene oder daran gebundene dsRNA im Körper transportieren und freisetzen. Die dsRNA kann oral, mittels Inhalation, Infusion oder Injektion, insbesondere intravenöser, intraperitonealer oder intratumoraler Infusion oder Injektion, verabreicht werden. Vorzugsweise wird die dsRNA in einer Dosierung von höchstens 5 mg, insbesondere höchstens 2,5 mg, bevorzugt höchstens 200 µg, besonders bevorzugt höchstens 100 µg, vorzugsweise höchstens 50 µg, insbesondere höchstens 25 µg, pro kg Körpergewicht und Tag verwendet. Es hat es sich nämlich gezeigt, dass die dsRNA bereits in dieser Dosierung eine ausgezeichnete Effektivität in der Hemmung der Expression des vorgegebenen Zielgens aufweist.

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Medikament zur gezielten Hemmung der Expression eines vorgegebenen, gegenüber einem Ursprungsgen punktmutierten Zielgens in einer Zelle, wobei das Medikament eine doppelsträngige Ribonukleinsäure(dsRNA) enthält, wobei ein Strang S1 der dsRNA einen zum Zielgen kom-

plementären Bereich aufweist, in welchem mindestens ein Nukleotid nicht komplementär zum Zielgen ist und die Anzahl der Nukleotide, welche nicht komplementär zum Ursprungsgen sind, um mindestens eins höher ist als die Anzahl der Nukleotide, welche nicht komplementär zum Zielgen sind. Vorzugsweise liegt das Medikament in mindestens einer Verabreichungseinheit vor, welche die dsRNA in einer Menge enthält, die eine Dosierung von höchstens 5 mg, insbesondere höchstens 2,5 mg, bevorzugt höchstens 200 µg, besonders bevorzugt höchstens 100 µg, vorzugsweise höchstens 50 µg, insbesondere höchstens 25 µg, pro kg Körpergewicht und Tag ermöglicht. Die Verabreichungseinheit kann für eine einmalige Verabreichung bzw. Einnahme pro Tag konzipiert sein. Dann ist die gesamte Tagesdosis in einer Verabreichungseinheit enthalten. Ist die Verabreichungseinheit für eine mehrmalige Verabreichung bzw. Einnahme pro Tag konzipiert, so ist die dsRNA darin in einer entsprechend geringeren das Erreichen der Tagesdosis ermöglichenden Menge enthalten. Die Verabreichungseinheit kann auch für eine einzige Verabreichung bzw. Einnahme für mehrere Tage konzipiert sein, z. B. indem die dsRNA über mehrere Tage freigesetzt wird. Die Verabreichungseinheit enthält dann ein entsprechend Mehrfaches der Tagesdosis.

Erfindungsgemäß ist weiterhin ein Verfahren zur gezielten Hemmung der Expression eines vorgegebenen, gegenüber einem Ursprungsgen punktmutierten Zielgens in einer Zelle vorgesehen, wobei eine doppelsträngige Ribonukleinsäure(dsRNA) in die Zelle eingeführt wird und ein Strang S1 der dsRNA einem zum Zielgen komplementären Bereich aufweist, in welchem mindestens ein Nukleotid nicht komplementär zum Zielgen ist und die Anzahl der Nukleotide, welche nicht komplementär zum Ursprungsgen sind, um mindestens eins höher ist als die Anzahl der Nukleotide, welche nicht komplementär zum Zielgen sind.

Wegen der weiteren vorteilhaften Ausgestaltungen des erfindungsgemäßen Medikaments und des erfindungsgemäßen Verfahrens wird auf die vorangegangenen Ausführungen verwiesen.

- 5 Die Erfindung wird nachfolgend anhand der Zeichnungen beispielhaft erläutert. Es zeigen:

Fig. 1 eine grafische Darstellung der Hemmung der Expression eines HCV-Luziferase-Fusionsproteins durch  
10 dsRNAs, welche in unterschiedlichem Maße komplementär zu einer Sequenz eines Zielgens sind und

Fig. 2 eine grafische Darstellung der Hemmung der Expression eines HCV-Luziferase-Fusionsproteins durch  
15 dsRNAs, welche in unterschiedlichem Maße komplementär zu einer Sequenz eines Zielgens sind und teilweise aus nicht vollständig zueinander komplementären RNA-Strängen gebildet sind.

20 Zu Herstellung eines Reportersystems wurde eine 26 Nukleotide lange Sequenz einer als Zielgen dienenden, dem 3'-nicht-translatierten Bereich einer HCV-RNA entsprechenden cDNA-Sequenz mit dem offenen Leserahmen des Luziferase-Gens aus dem Expressionsvektor pGL3 fusioniert. Der Expressionsvektor  
25 pGL3 stammt von der Firma Promega und ist unter der Gene Accession Number U47296 beim National Center for Biotechnology Information (NCBI), National Library of Medicine, Building 38A, Bethesda, MD 20894, USA, registriert worden. Als Luziferase-Gen sind die Nukleotide 280 bis 1932 verwendet worden.  
30 Die 26 Nukleotide lange Sequenz ist eine in sehr vielen HCV-Genomen und deren Subtypen vorkommende hoch konservierte Sequenz. Bei dem unter der Gene Accession Number D89815 beim NCBI registrierten HCV-Genom entsprechen die 26 Nukleotide den Nukleotiden 9531 bis 9556. Sie weisen die folgende  
35 Sequenz auf:

5'-gtcacgggt agctgtgaaa ggtccgt-3' (SEQ ID NO: 1).

Das resultierende Fusions-Gen ist als BamHI/NotI-DNA-Fragment  
5 in das eukaryotische Expressionsplasmid pcDNA 3.1 (+) von der  
Firma Invitrogen GmbH, Technologiepark Karlsruhe, Emmy-  
Noether Strasse 10, D-76131 Karlsruhe, Katalog Nr. V790-20,  
kloniert worden. Das resultierende Plasmid wird als p8 be-  
zeichnet.

10 Als Kontrolle für die Transfektionseffizienz ist das Plasmid  
pCMV $\beta$ Gal der Firma Clontech, Gene Accession Number U13186,  
NCBI, verwendet worden. Dieses Plasmid kodiert für das Enzym  
 $\beta$ -Galaktosidase und bewirkt dessen Expression.

15 Das das Fusions-Gen enthaltende Plasmid, das zur Kontrolle  
dienende Plasmid und unterschiedliche dsRNAs sind gemeinsam  
durch Transfektion in Zellen der Leberzelllinie HuH-7  
(JCRB0403, Japanese Collection of Research Bioresources  
20 Cell Bank, National Institute of Health Sciences, Kamiyoga 1-  
18-1, Setagaya-ku, Tokyo 158, Japan) eingeführt worden. Die  
durch die dsRNAs herbeigeführte Hemmung der Expression des  
Luziferase-Gens ist im Verhältnis zur Expression des  $\beta$ -  
Galaktosidase-Gens bestimmt worden.

25 Die eingesetzten dsRNAs weisen folgende, im Sequenzprotokoll  
mit SEQ ID NO:2 bis SEQ ID NO:13 bezeichneten Sequenzen auf:

HCV1+2, deren Strang S1 vollständig komplementär zu der HCV-  
30 Sequenz in dem fusionierten HCV-Luziferase-Gen ist:

S2: 5'- ACG GCU AGC UGU GAA AGG UCC GU-3' (SEQ ID NO:2)

S1: 3'-AG UGC CGA UCG ACA CUU UCC AGG -5' (SEQ ID NO:3)

HCV3+4, welche weder zu der HCV- noch zu der Luziferase-Sequenz in dem fusionierten HCV-Luziferase-Gen komplementär ist und als Negativkontrolle dient:

5 S2: 5'- AGA CAG UCG ACU UCA GCC U GG-3' (SEQ ID NO:12)  
S1: 3'-GG UCU GUC AGC UGA AGU CGG A -5' (SEQ ID NO:13)

HCV5+6, deren Strang S1 abgesehen von dem durch Fettdruck hervorgehobenen Nukleotid komplementär zu der HCV-Sequenz in dem fusionierten HCV-Luziferase-Gen ist:

S2: 5'- ACG GCU AGC UGU GAA **UGG** UCC GU-3' (SEQ ID NO:6)  
S1: 3'-AG UGC CGA UCG ACA CUU **ACC** AGG -5' (SEQ ID NO:7)

15 HCV7+8, deren Strang S1 abgesehen von den zwei durch Fettdruck hervorgehobenen Nukleotiden komplementär zu der HCV-Sequenz in dem fusionierten HCV-Luziferase-Gen ist:

S2: 5'- ACG **GCA** AGC UGU GAA **UGG** UCC GU-3' (SEQ ID NO:8)  
20 S1: 3'-AG UGC **CGU** UCG ACA CUU **ACC** AGG -5' (SEQ ID NO:9)

Luc1+2, deren Strang S1 vollständig komplementär zu einer Luziferase-Sequenz in dem fusionierten HCV-Luziferase-Gen ist und als Positivkontrolle dient:

25 S2: 5'- CGU UAU UUA UCG GAG UUG CAG UU-3' (SEQ ID NO: 10)  
S1: 3'-GC GCA AUA AAU AGC CUC AAC GUC -5' (SEQ ID NO: 11)

K3s+K3as, welche weder zu der HCV- noch zu einer Luziferase-Sequenz in dem fusionierten HCV-Luziferase-Gen komplementär ist und als Negativkontrolle dient:

S2: 5'- G AUG AGG AUC GUU UCG CAU GA-3' (SEQ ID NO: 4)  
S1: 3'-UCC UAC UCC UAG CAA AGC GUA -5' (SEQ ID NO: 5)

HCV5+2, deren Strang S1 vollständig komplementär zu der HCV-Sequenz ist und deren Strang S2 abgesehen von dem durch Fettdruck hervorgehobenen Nukleotid komplementär zu der HCV-Sequenz in dem fusionierten HCV-Luziferase-Gen ist:

5

S2: 5'- ACG GCU AGC UGU GAA **UGG** UCC GU-3' (SEQ ID NO:6)

S1: 3'-AG UGC CGA UCG ACA CUU UCC AGG -5' (SEQ ID NO:3)

10 HCV1+6, deren Strang S2 vollständig komplementär zu der HCV-Sequenz ist und deren Strang S1 abgesehen von dem durch Fettdruck hervorgehobenen Nukleotid komplementär zu der HCV-Sequenz in dem fusionierten HCV-Luziferase-Gen ist:

S2: 5'- ACG GCU AGC UGU GAA AGG UCC GU-3' (SEQ ID NO:2)

15 S1: 3'-AG UGC CGA UCG ACA CUU **ACC** AGG -5' (SEQ ID NO:7)

HuH-7-Zellen sind in DMEM mit 10 % FCS kultiviert worden. Zur Vorbereitung einer Transfektion wurden 2 x 10E4 Zellen pro Vertiefung einer 96-Well-Zellkulturplatte ausgesät. Die Zellen sind 24 Stunden nach der Aussaat mittels je 110 µl Transfektionsmedium pro Vertiefung der 96-Well-Zellkulturplatte transfiziert und in diesem Gesamtvolumen weiter kultiviert worden. Jede Transfektion ist dreifach durchgeführt worden.

25 Dazu sind zunächst 3 µg des Plasmids pCMVβGal mit 1 µg des Plasmids p8 gemischt worden. Das Transfektionsmedium enthielt je Vertiefung 0,25 µg des Gemischs der Plasmide und 200, 100, 50, 25, 12,5 oder 0 nmol/l einer der genannten dsRNAs.

30 Zur Transfektion wurde "Gene Porter 2" der Firma PEQLAB Biotechnologie GmbH, Carl-Thiersch-Str. 2 b, D-91052 Erlangen, Katalog Nummer 13-T202007 gemäß Herstellervorschrift eingesetzt.

Anschließend sind die Zellen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert worden. Einen Tag nach der Transfektion sind pro Vertiefung 35 µl frisches Medium zugegeben und die Zellen für weitere 24 h inkubiert worden.

5

Der Effekt der eingesetzten dsRNAs wurde durch Quantifizierung der exprimierten  $\beta$ -Galactosidase mittels "Galacto-Star" der Firma Tropix, 47 Wiggins Avenue, Bedford, MA 01730, USA Katalog-Nummer BM100S, und der Effekt der exprimierten Luziferase mittels "Luciferase" der Firma Tropix, Katalog-Nummer BC100L, durch Chemolumineszenz-Reaktion ermittelt. Dazu wurden Lysate der Zellen gemäß den Herstellervorschriften hergestellt und davon für den Nachweis der  $\beta$ -Galactosidase je 2 µl pro Analyse und für den Nachweis der Luziferase je 5 µl pro Analyse eingesetzt. Die Messung der Chemolumineszenz erfolgte in einem Sirius-Luminometer der Firma Berthold Detection Systems GmbH, Bleichstrasse 56-68, D-75173 Pforzheim, Deutschland. Die relative Aktivität der Luziferase als Maß für die Expression wird ermittelt, indem jeweils der für Luziferase ermittelte Wert der Chemolumineszenz durch den für  $\beta$ -Galactosidase ermittelten Wert dividiert wird. Für jeweils 3 so ermittelte Werte wird ein Mittelwert berechnet. Der Mittelwert für ohne dsRNA transfizierte Zellen wird willkürlich als 1,0 definiert. Die anderen Mittelwerte sind dazu ins Verhältnis gesetzt und in den Figuren 1 und 2 grafisch dargestellt.

Luc1+2 (Positivkontrolle) führte zur stärksten Hemmung der Luziferaseaktivität (Fig. 1 und 2). In Gegenwart von HCV1+2, welches vollständig komplementär zur Zielsequenz für das Reporterplasmid war, ist ebenfalls eine deutliche Reduktion der Luziferaseaktivität erkennbar (Fig. 1 und 2). Mit abnehmender Konzentration von HCV1+2 stieg die Luziferaseaktivität an. Das in einem Nukleotid nicht zur Zielsequenz komplementäre Oligonukleotid HCV5+6 ist ähnlich effizient in der Luzifera-

sehemmung wie HCV1+2, insbesondere bei niedrigen Konzentrationen (Fig. 1). Für die Spezifität dieser dsRNA bedeutet das, dass es nicht ausreicht, wenn die dsRNA zum Zielgen komplementär, aber zum Ursprungsgen mit einem Nukleotid nicht  
5 komplementär ist, um die Expression des Zielgens spezifisch gegenüber der Expression des Ursprungsgens zu hemmen.

HCV7+8 hemmt die Expression der Luziferase sowohl bei hohen als auch bei niedrigen Konzentrationen nur im Maße der Negativkontrollen HCV3+4 und K3S+K3AS (Fig. 1 und 2). Die geringe  
10 Hemmung der Luziferaseaktivität ist als unspezifischer Effekt zu erachten. Für die Spezifität dieser dsRNA bedeutet das, dass es ausreicht, wenn die dsRNA zu dem Zielgen komplementär oder nur mit einem Nukleotid nicht komplementär, aber zum Ursprungsgen in zwei Nukleotiden nicht komplementär ist, um die  
15 Expression des Zielgens spezifisch gegenüber der Expression des Ursprungsgens zu hemmen.

In HCV5+2 ist ein Nukleotid im Sinn-Strang S2 nicht komplementär zum Antisinn-Strang S1, wobei der Antisinn-Strang S1 vollständig komplementär zum Zielgen ist. Diese dsRNA ist so  
20 effizient wie LUC1+2 und HCV1+2 (Fig. 1 + 2). Das ist überraschend, da eine um ein Basenpaar reduzierte Komplementarität innerhalb der dsRNA eine geringere Stabilität der dsRNA in der Zelle und deshalb eine geringere Effizienz erwarten ließ.  
25

In HCV6+1 ist ein Nukleotid im Antisinn-Strang S1 nicht komplementär zum Sinn-Strang S2, wobei der Antisinn-Strang S1 auch mit einem Nukleotid nicht komplementär zum Zielgen ist.  
30 HCV6+1 hemmt die Expression weniger effizient als HCV5+6, aber effizienter als HCV7+8 (Fig. 2). Für die Spezifität und Effizienz der expressionshemmenden Wirkung der dsRNA kommt es somit mehr auf die Sequenz des Antisinn-Strangs S1 als diejenige des Sinn-Strangs S2 an.

Die als Negativkontrolle dienenden HCV3+4 (Fig. 1) und K3S+K3AS (Fig. 2) führten zu keiner bzw. einer geringen Hemmung der Luziferase-Aktivität. Die geringe Hemmung ist unspezifisch, da sie nicht von der eingesetzten Konzentration der dsRNAs abhängt.

Die Daten zeigen, dass mindestens zwei nicht zu einem Ursprungsgen komplementäre Nukleotide im Antisinn-Strang einer dsRNA notwendig sind, um eine Inhibition der Expression des Ursprungsgens zu verhindern. Weiterhin zeigen die Daten, dass eine Modulation der Wirksamkeit der Hemmung der Expression durch eine dsRNA möglich ist, indem das Maß der Komplementarität der die dsRNA bildenden Einzelstränge verringert wird.

## Patentansprüche

1. Verwendung einer doppelsträngigen Ribonukleinsäure (dsRNA) zur gezielten Hemmung der Expression eines vorgegebenen, gegenüber einem Ursprungsgen punktmutierten Zielgens in einer Zelle, wobei ein Strang S1 der dsRNA einen zum Zielgen komplementären Bereich aufweist, in welchem mindestens ein Nukleotid nicht komplementär zum Zielgen ist und die Anzahl der Nukleotide, welche nicht komplementär zum Ursprungsgen sind, um mindestens eins höher ist als die Anzahl der Nukleotide, welche nicht komplementär zum Zielgen sind.
2. Verwendung einer doppelsträngigen Ribonukleinsäure (dsRNA) zur Herstellung eines Medikaments zur gezielten Hemmung der Expression eines vorgegebenen, gegenüber einem Ursprungsgen punktmutierten Zielgens in einer Zelle, wobei ein Strang S1 der dsRNA einen zum Zielgen komplementären Bereich aufweist, in welchem mindestens ein Nukleotid nicht komplementär zum Zielgen ist und die Anzahl der Nukleotide, welche nicht komplementär zum Ursprungsgen sind, um mindestens eins höher ist als die Anzahl der Nukleotide, welche nicht komplementär zum Zielgen sind.
3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, wobei das zum Zielgen nicht komplementäre Nukleotid nicht am 3'- oder am 5'-Ende des Bereichs gelegen ist.
4. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Zielgen gegenüber dem Ursprungsgen eine oder zwei Punktmutationen aufweist.
5. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Ursprungsgen ein Proto-Onkogen und das Zielgen ein davon abgeleitetes Onkogen ist.

6. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Zelle eine Tumorzelle ist.
7. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei ein Nukleotid des Bereichs nicht komplementär zum Zielgen ist und zwei Nukleotide des Bereichs nicht komplementär zum Ursprungsgen sind.
8. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei innerhalb der dsRNA mindestens ein Basenpaar nicht komplementär ist.
9. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA zumindest an einem Ende der dsRNA einen aus 1 bis 4, insbesondere 2 oder 3, Nukleotiden gebildeten einzelsträngigen Überhang aufweist.
10. Verwendung nach Anspruch 9, wobei die dsRNA den Überhang ausschließlich an einem, insbesondere ihrem das 3'-Ende des Strangs S1 aufweisenden, Ende aufweist.
11. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA neben dem Strang S1 einen Strang S2 aufweist und der Strang S1 eine Länge von 23 Nukleotiden, der Strang S2 eine Länge von 21 Nukleotiden und das 3'-Ende des Strangs S1 einen aus zwei Nukleotiden gebildeten einzelsträngigen Überhang aufweist, während das am 5'-Ende des Strangs S1 gelegene Ende der dsRNA glatt ausgebildet ist.
12. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Strang S1 zum primären oder prozessierten RNA-Transkript des Zielgens komplementär ist.
13. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA in einer Zubereitung vorliegt, die zur Inhalation, oralen Aufnahme, Infusion oder Injektion, insbesondere

dere zur intravenösen, intraperitonealen oder intratumoralen Infusion oder Injektion, geeignet ist.

14. Verwendung nach Anspruch 13, wobei die Zubereitung, insbesondere ausschließlich, aus einem physiologisch ver-  
5 träglichen Lösungsmittel, vorzugsweise einer physiologischen Kochsalzlösung oder einem physiologisch verträglichen Puffer, insbesondere einer phosphatgepufferten Salzlösung,, und der dsRNA besteht.
15. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei  
10 die dsRNA in einer physiologisch verträglichen Lösung, insbesondere einem physiologisch verträglichen Puffer oder einer physiologischen Kochsalzlösung, oder von einer micellaren Struktur, vorzugsweise einem Liposom, einem Virus-Kapsid, einem Kapsid oder einer polymeren Nano-  
15 oder Mikrokapsel umschlossen oder an einer polymeren Nano- oder Mikrokapsel gebunden vorliegt.
16. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei  
20 die dsRNA oral, mittels Inhalation, Infusion oder Injektion, insbesondere intravenöser, intraperitonealer oder intratumoraler Infusion oder Injektion, verabreicht wird.
17. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei  
25 die dsRNA in einer Dosierung von höchstens 5 mg, insbesondere höchstens 2,5 mg, bevorzugt höchstens 200 µg, besonders bevorzugt höchstens 100 µg, vorzugsweise höchstens 50 µg, insbesondere höchstens 25 µg, pro kg Körpergewicht und Tag verwendet wird.
18. Medikament zur gezielten Hemmung der Expression eines  
30 vorgegebenen, gegenüber einem Ursprungsgen punktmutierten Zielgens in einer Zelle, wobei das Medikament eine doppelsträngige Ribonukleinsäure (dsRNA) enthält, deren einer Strang S1 einen zum Zielgen komplementären Bereich aufweist, in welchem mindestens ein Nukleotid nicht kom-

plementär zum Zielgen ist und die Anzahl der Nukleotide, welche nicht komplementär zum Ursprungsgen sind, um mindestens eins höher ist als die Anzahl der Nukleotide, welche nicht komplementär zum Zielgen sind.

- 5 19. Medikament nach Anspruch 18, wobei das zum Zielgen nicht komplementäre Nukleotid nicht am 3'- oder am 5'-Ende des Bereichs gelegen ist.
20. Medikament nach Anspruch 18 oder 19, wobei das Zielgen gegenüber dem Ursprungsgen eine oder zwei Punktmutationen  
10 aufweist.
21. Medikament nach einem der Ansprüche 18 bis 20, wobei das Ursprungsgen ein Proto-Onkogen und das Zielgen ein davon abgeleitetes Onkogen ist.
22. Medikament nach einem der Ansprüche 18 bis 21, wobei die  
15 Zelle eine Tumorzelle ist.
23. Medikament nach einem der Ansprüche 18 bis 22, wobei ein Nukleotid des Bereichs nicht komplementär zum Zielgen ist und zwei Nukleotide des Bereichs nicht komplementär zum Ursprungsgen sind.
- 20 24. Medikament nach einem der Ansprüche 18 bis 23, wobei innerhalb der dsRNA mindestens ein Basenpaar nicht komplementär ist
- 25 25. Medikament nach einem der Ansprüche 18 bis 24, wobei die dsRNA zumindest an einem Ende der dsRNA einen aus 1 bis 4, insbesondere 2 oder 3, Nukleotiden gebildeten einzelsträngigen Überhang aufweist.
26. Medikament nach Anspruch 25, wobei die dsRNA den Überhang ausschließlich an einem, insbesondere ihrem das 3'-Ende des Strangs S1 aufweisenden, Ende aufweist.

27. Medikament nach Anspruch 26, wobei die dsRNA neben dem Strang S1 einen Strang S2 aufweist und der Strang S1 eine Länge von 23 Nukleotiden, der Strang S2 eine Länge von 21 Nukleotiden und das 3'-Ende des Strangs S1 einen aus zwei Nukleotiden gebildeten einzelsträngigen Überhang aufweist, während das am 5'-Ende des Strangs S1 gelegene Ende der dsRNA glatt ausgebildet ist.
28. Medikament nach einem der Ansprüche 18 bis 27, wobei der Strang S1 zum primären oder prozessierten RNA-Transkript des Zielgens komplementär ist.
29. Medikament nach einem der Ansprüche 18 bis 28, wobei das Medikament eine Zubereitung aufweist, die zur Inhalation, oralen Aufnahme, Infusion oder Injektion, insbesondere zur intravenösen, intraperitonealen oder intratumoralen Infusion oder Injektion, geeignet ist.
30. Medikament nach Anspruch 29, wobei die Zubereitung, insbesondere ausschließlich, aus einem physiologisch verträglichen Lösungsmittel, vorzugsweise einer physiologischen Kochsalzlösung oder einem physiologisch verträglichen Puffer, insbesondere einer phosphatgepufferten Salzlösung,, und der dsRNA besteht.
31. Medikament nach einem der Ansprüche 18 bis 30, wobei die dsRNA in dem Medikament in einer Lösung, insbesondere einem physiologisch verträglichen Puffer oder einer physiologischen Kochsalzlösung, oder von einer micellaren Struktur, vorzugsweise einem Liposom, einem Virus-Kapsid, einem Kapsoid oder einer polymeren Nano- oder Mikrokapsel umschlossen oder an einer polymeren Nano- oder Mikrokapsel gebunden vorliegt.
32. Medikament nach einem der Ansprüche 18 bis 31, wobei das Medikament in mindestens einer Verabreichungseinheit vorliegt, welche die dsRNA in einer Menge enthält, die eine

Dosierung von höchstens 5 mg, insbesondere höchstens 2,5 mg, bevorzugt höchstens 200  $\mu$ g, besonders bevorzugt höchstens 100  $\mu$ g, vorzugsweise höchstens 50  $\mu$ g, insbesondere höchstens 25  $\mu$ g, pro kg Körpergewicht und Tag ermöglicht.

- 5 33. Verfahren zur gezielten Hemmung der Expression eines vorgegebenen, gegenüber einem Ursprungsgen punktmutierten Zielgens in einer Zelle, wobei eine doppelsträngige Ribonukleinsäure(dsRNA) in die Zelle eingeführt wird und ein Strang S1 der dsRNA einen zum Zielgen komplementären Bereich aufweist, in welchem mindestens ein Nukleotid nicht komplementär zum Zielgen ist und die Anzahl der Nukleotide, welche nicht komplementär zum Ursprungsgen sind, um mindestens eins höher ist als die Anzahl der Nukleotide, welche nicht komplementär zum Zielgen sind.
- 10
- 15 34. Verfahren nach Anspruch 33, wobei das zum Zielgen nicht komplementäre Nukleotid nicht am 3'- oder am 5'-Ende des Bereichs gelegen ist.
35. Verfahren nach Anspruch 33 oder 34, wobei das Zielgen gegenüber dem Ursprungsgen eine oder zwei Punktmutationen aufweist.
- 20
36. Verfahren nach einem der Ansprüche 33 bis 35, wobei das Ursprungsgen ein Proto-Onkogen und das Zielgen ein davon abgeleitetes Onkogen ist.
37. Verfahren nach einem der Ansprüche 33 bis 36, wobei die Zelle eine Tumorzelle ist.
- 25
38. Verfahren nach einem der Ansprüche 33 bis 37, wobei ein Nukleotid des Bereichs nicht komplementär zum Zielgen ist und zwei Nukleotide des Bereichs nicht komplementär zum Ursprungsgen sind.

39. Verfahren nach einem der Ansprüche 33 bis 38, wobei innerhalb der dsRNA mindestens ein Basenpaar nicht komplementär ist.
- 5 40. Verfahren nach einem der Ansprüche 33 bis 39, wobei die dsRNA zumindest an einem Ende der dsRNA einen aus 1 bis 4, insbesondere 2 oder 3, Nukleotiden gebildeten einzelsträngigen Überhang aufweist.
- 10 41. Verfahren nach Anspruch 40, wobei die dsRNA den Überhang ausschließlich an einem, insbesondere ihrem das 3'-Ende des Strangs S1 aufweisenden, Ende aufweist.
- 15 42. Verfahren nach Anspruch 41, wobei die dsRNA neben dem Strang S1 einen Strang S2 aufweist und der Strang S1 eine Länge von 23 Nukleotiden, der Strang S2 eine Länge von 21 Nukleotiden und das 3'-Ende des Strangs S1 einen aus zwei Nukleotiden gebildeten einzelsträngigen Überhang aufweist, während das am 5'-Ende des Strangs S1 gelegene Ende der dsRNA glatt ausgebildet ist.
- 20 43. Verfahren nach einem der Ansprüche 33 bis 42, wobei der Strang S1 zum primären oder prozessierten RNA-Transkript des Zielgens komplementär ist.
- 25 44. Verfahren nach einem der Ansprüche 33 bis 43, wobei die dsRNA in einer Lösung, insbesondere einem physiologisch verträglichen Puffer oder einer physiologischen Kochsalzlösung, oder von einer micellaren Struktur, vorzugsweise einem Liposom, einem Virus-Kapsid, einem Kapsoid oder einer polymeren Nano- oder Mikrokapsel umschlossen oder an einer polymeren Nano- oder Mikrokapsel gebunden vorliegt.

1/2

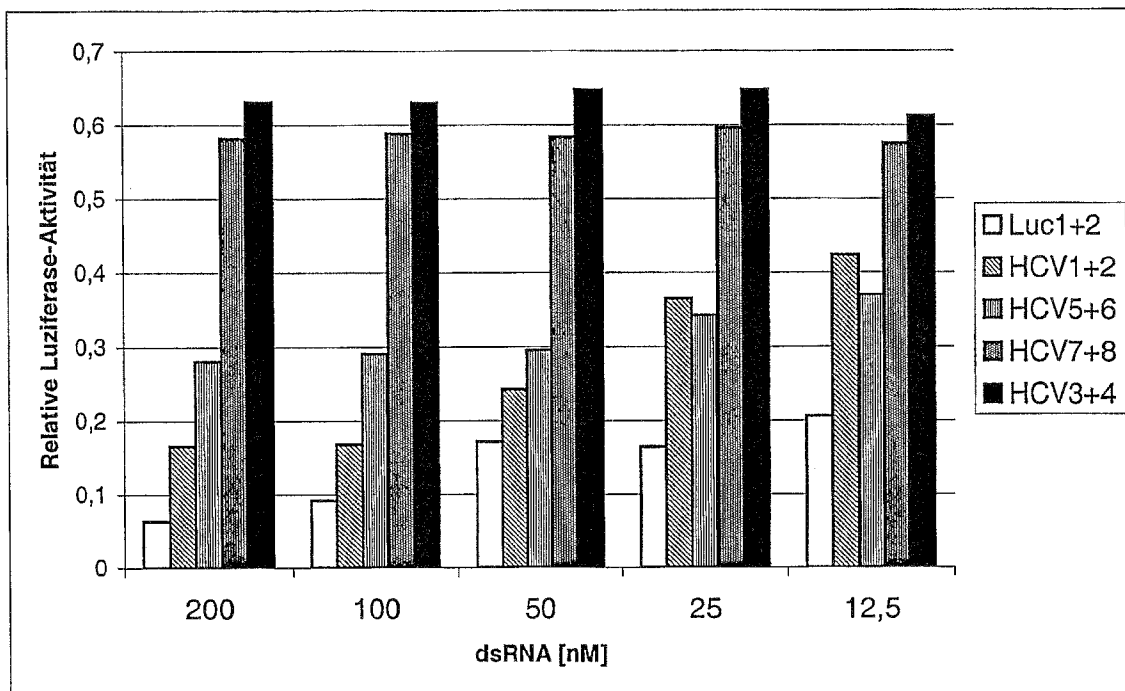


Fig. 1

2/2

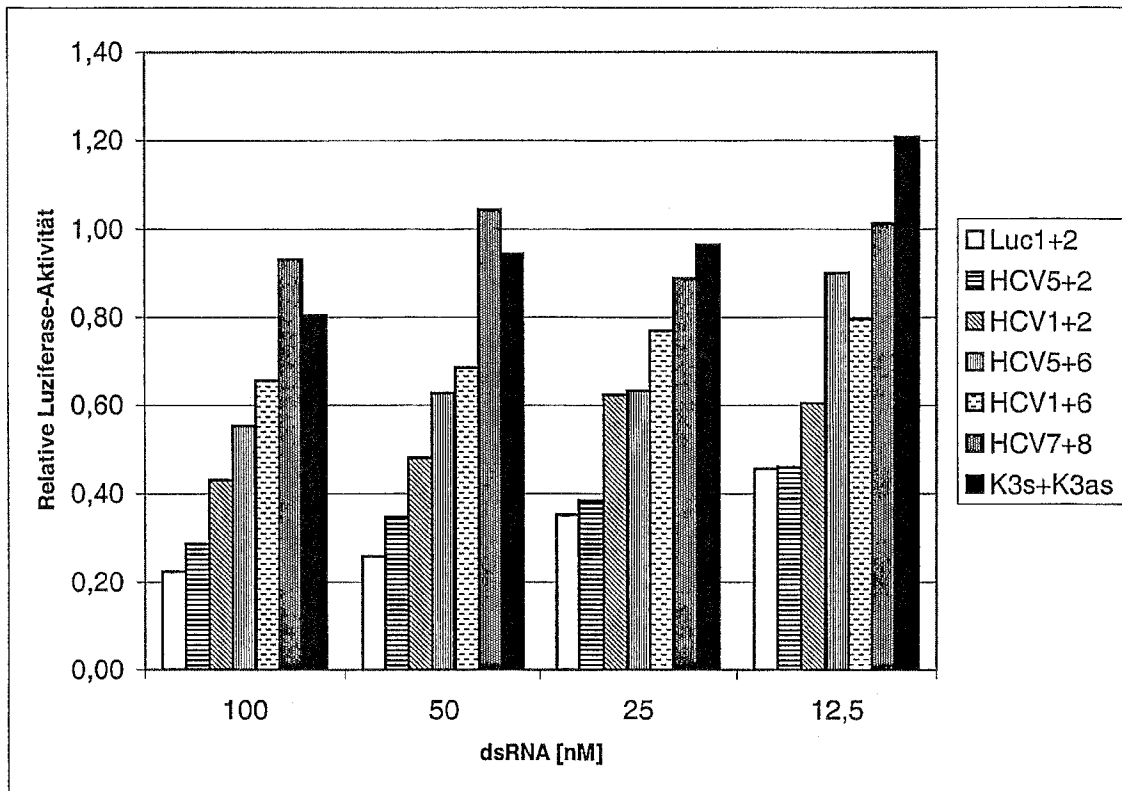


Fig. 2

1/3

## SEQUENZPROTOKOLL

&lt;110&gt; Ribopharma AG

5 <120> Verwendung einer doppelsträngigen Ribonukleinsäure zur  
gezielten Hemmung der Expression eines vorgegebenen  
Zielgens

&lt;130&gt; 422290EH

10

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

&lt;160&gt; 13

15

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 26

20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Hepatitis C virus

&lt;400&gt; 1

25

gtcacggcta gctgtgaaag gtcctg

26

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; RNA

30

&lt;213&gt; Hepatitis C virus

&lt;400&gt; 2

acggcuagcu gugaaagguc cgu

23

35

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Hepatitis C virus

40

&lt;400&gt; 3

ggaccuuuca cagcuagccg uga

23

45

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

50

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sinn-Strang  
einer zu einer Sequenz des Neomycin-Resistenzgens  
komplementären dsRNA

55

&lt;400&gt; 4

gaugaggauc guuucgcaug a

21

60

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

2/3

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Beschreibung der künstlichen Sequenz:

5 Antisinn-Strang einer zu einer Sequenz des  
Neomycin-Resistenzgens komplementären dsRNA

&lt;400&gt; 5

10 augcgaaacg auccucaucc u 21

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; RNA

15 <213> Hepatitis C virus

&lt;400&gt; 6

20 acggcuagcu gugaauagguc cgu 23

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; RNA

25 <213> Hepatitis C virus

&lt;400&gt; 7

30 ggaccuuca cagcuagccg uga 23

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; RNA

35 <213> Hepatitis C virus

&lt;400&gt; 8

40 acggcaagcu gugaauagguc cgu 23

&lt;210&gt; 9

45 <211> 23

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Hepatitis C virus

&lt;400&gt; 9

50 ggaccuuca cagcuugccg uga 23

&lt;210&gt; 10

55 <211> 23

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

60 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sinn-Strang  
einer zu einer Sequenz des Luziferasegens  
komplementären dsRNA

&lt;400&gt; 10

cguaauuuau cggaguugca guu 23

3/3

5 <210> 11  
<211> 23  
<212> RNA  
<213> Künstliche Sequenz  
<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
Antisinn-Strang einer zu einer Sequenz des  
Luziferasegens komplementären dsRNA  
10 <400> 11  
cugcaacucc gauaaauaac gcg 23

15 <210> 12  
<211> 21  
<212> RNA  
<213> Hepatitis C virus  
20 <400> 12  
agacagucga cuucagccug g 21

25 <210> 13  
<211> 21  
<212> RNA  
<213> Hepatitis C virus  
30 <400> 13  
aggcugaagu cgacugucug g 21

35

40

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat Application No

PCT/EP 02/11969

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/11 A61K31/713 C12N15/88 A61P35/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data, SEQUENCE SEARCH

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>PARRISH S ET AL: "Functional anatomy of a dsRNA trigger: Differential requirement for the two trigger strands in RNA interference"</p> <p>MOLECULAR CELL, CELL PRESS, CAMBRIDGE, MA, US,</p> <p>vol. 6, no. 5, November 2000 (2000-11), pages 1077-1087, XP002226298</p> <p>ISSN: 1097-2765</p> <p>page 1079, right-hand column; figure 3</p> <p style="text-align: center;">---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1-44

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents:

\*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

\*E\* earlier document but published on or after the international filing date

\*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

\*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

\*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*&amp;\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 February 2003

Date of mailing of the international search report

13/03/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Armandola, E

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internati Application No

PCT/EP 02/11969

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PASQUINELLI A E ET AL: "Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA." NATURE. ENGLAND 2 NOV 2000, vol. 408, no. 6808, 2 November 2000 (2000-11-02), pages 86-89, XP002232888 ISSN: 0028-0836	1-4,8, 12, 18-20, 23,24, 28, 33-35,43
Y	the whole document	13-16, 29-31,44
P,X	--- JACQUE JEAN-MARC ET AL: "Modulation of HIV-1 replication by RNA interference." NATURE. ENGLAND 25 JUL 2002, vol. 418, no. 6896, 25 July 2002 (2002-07-25), pages 435-438, XP002232889 ISSN: 0028-0836 the whole document	1-44
P,X	--- HAMADA MAKIKO ET AL: "Effects on RNA interference in gene expression (RNAi) in cultured mammalian cells of mismatches and the introduction of chemical modifications at the 3'-ends of siRNAs." ANTISENSE & NUCLEIC ACID DRUG DEVELOPMENT. UNITED STATES OCT 2002, vol. 12, no. 5, October 2002 (2002-10), pages 301-309, XP009006637 ISSN: 1087-2906 page 305, column 307; figure 4	1-44
P,X	--- HOLEN TORGEIR ET AL: "Positional effects of short interfering RNAs targeting the human coagulation trigger Tissue Factor." NUCLEIC ACIDS RESEARCH. ENGLAND 15 APR 2002, vol. 30, no. 8, 15 April 2002 (2002-04-15), pages 1757-1766, XP002232890 ISSN: 1362-4962 cited in the application page 1762, right-hand column -page 1765, left-hand column; figure 6	1-44
P,Y	--- WO 02 055692 A (VORNLOCHER HANS-PETER ;LIMMER STEFAN (DE); RIBOPHARMA AG (DE); GEI) 18 July 2002 (2002-07-18) the whole document	1-44
P,Y	--- WO 02 055693 A (RIBOPHARMA AG ;ROST SYLVIA (DE); KREUTZER ROLAND (DE); LIMMER STEP) 18 July 2002 (2002-07-18) the whole document	1-44
	---	

-/--

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat Application No

PCT/EP 02/11969

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 00 44895 A (KREUTZER ROLAND ;LIMMER STEPHAN (DE)) 3 August 2000 (2000-08-03) page 9, line 6 - line 20 ---	1-44
Y	ZAMORE PHILLIP D ET AL: "RNAi: Double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals" CELL, CELL PRESS, CAMBRIDGE, NA, US, vol. 101, no. 1, 31 March 2000 (2000-03-31), pages 25-33, XP002208683 ISSN: 0092-8674 the whole document -----	11-17, 27-32, 42-44

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internati	Application No
PCT/EP 02/11969	

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)	Publication date
WO 02055692	A	18-07-2002	DE	10100586 C1	11-04-2002
			WO	02055692 A2	18-07-2002
			WO	02055693 A2	18-07-2002
WO 02055693	A	18-07-2002	DE	10100586 C1	11-04-2002
			WO	02055692 A2	18-07-2002
			WO	02055693 A2	18-07-2002
WO 0044895	A	03-08-2000	DE	19956568 A1	17-08-2000
			AT	222953 T	15-09-2002
			AU	3271300 A	18-08-2000
			CA	2359180 A1	03-08-2000
			WO	0044895 A1	03-08-2000
			DE	10080167 D2	28-02-2002
			DE	50000414 D1	02-10-2002
			EP	1144623 A1	17-10-2001
			EP	1214945 A2	19-06-2002
			JP	2003502012 T	21-01-2003

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internat es Aktenzeichen

PCT/EP 02/11969

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N15/11 A61K31/713 C12N15/88 A61P35/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data, SEQUENCE SEARCH

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>PARRISH S ET AL: "Functional anatomy of a dsRNA trigger: Differential requirement for the two trigger strands in RNA interference"</p> <p>MOLECULAR CELL, CELL PRESS, CAMBRIDGE, MA, US,</p> <p>Bd. 6, Nr. 5, November 2000 (2000-11),</p> <p>Seiten 1077-1087, XP002226298</p> <p>ISSN: 1097-2765</p> <p>Seite 1079, rechte Spalte; Abbildung 3</p> <p style="text-align: center;">--- -/-</p>	1-44

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*Z\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

27. Februar 2003

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

13/03/2003

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Armandola, E

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internat <sup>ss</sup> Aktenzeichen

PCT/EP 02/11969

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Beir. Anspruch Nr.
X	PASQUINELLI A E ET AL: "Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA." NATURE. ENGLAND 2 NOV 2000, Bd. 408, Nr. 6808, 2. November 2000 (2000-11-02), Seiten 86-89, XP002232888 ISSN: 0028-0836	1-4,8, 12, 18-20, 23,24, 28, 33-35,43
Y	das ganze Dokument	13-16, 29-31,44
P,X	--- JACQUE JEAN-MARC ET AL: "Modulation of HIV-1 replication by RNA interference." NATURE. ENGLAND 25 JUL 2002, Bd. 418, Nr. 6896, 25. Juli 2002 (2002-07-25), Seiten 435-438, XP002232889 ISSN: 0028-0836 das ganze Dokument	1-44
P,X	--- HAMADA MAKIKO ET AL: "Effects on RNA interference in gene expression (RNAi) in cultured mammalian cells of mismatches and the introduction of chemical modifications at the 3'-ends of siRNAs." ANTISENSE & NUCLEIC ACID DRUG DEVELOPMENT. UNITED STATES OCT 2002, Bd. 12, Nr. 5, Oktober 2002 (2002-10), Seiten 301-309, XP009006637 ISSN: 1087-2906 Seite 305, Spalte 307; Abbildung 4	1-44
P,X	--- HOLEN TORGEIR ET AL: "Positional effects of short interfering RNAs targeting the human coagulation trigger Tissue Factor." NUCLEIC ACIDS RESEARCH. ENGLAND 15 APR 2002, Bd. 30, Nr. 8, 15. April 2002 (2002-04-15), Seiten 1757-1766, XP002232890 ISSN: 1362-4962 in der Anmeldung erwähnt Seite 1762, rechte Spalte -Seite 1765, linke Spalte; Abbildung 6	1-44
P,Y	--- WO 02 055692 A (VORNLOCHER HANS-PETER ;LIMMER STEFAN (DE); RIBOPHARMA AG (DE); GEI) 18. Juli 2002 (2002-07-18) das ganze Dokument	1-44
P,Y	--- WO 02 055693 A (RIBOPHARMA AG ;ROST SYLVIA (DE); KREUTZER ROLAND (DE); LIMMER STEP) 18. Juli 2002 (2002-07-18) das ganze Dokument	1-44
	---	

-/--

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internat es Aktenzeichen

PCT/EP 02/11969

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	WO 00 44895 A (KREUTZER ROLAND ;LIMMER STEPHAN (DE)) 3. August 2000 (2000-08-03) Seite 9, Zeile 6 - Zeile 20 -----	1-44
Y	ZAMORE PHILLIP D ET AL: "RNAi: Double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals" CELL, CELL PRESS, CAMBRIDGE, NA, US, Bd. 101, Nr. 1, 31. März 2000 (2000-03-31), Seiten 25-33, XP002208683 ISSN: 0092-8674 das ganze Dokument -----	11-17, 27-32, 42-44

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internatio Aktenzeichen

PCT/EP 02/11969

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 02055692	A	18-07-2002	DE	10100586 C1	11-04-2002
			WO	02055692 A2	18-07-2002
			WO	02055693 A2	18-07-2002
WO 02055693	A	18-07-2002	DE	10100586 C1	11-04-2002
			WO	02055692 A2	18-07-2002
			WO	02055693 A2	18-07-2002
WO 0044895	A	03-08-2000	DE	19956568 A1	17-08-2000
			AT	222953 T	15-09-2002
			AU	3271300 A	18-08-2000
			CA	2359180 A1	03-08-2000
			WO	0044895 A1	03-08-2000
			DE	10080167 D2	28-02-2002
			DE	50000414 D1	02-10-2002
			EP	1144623 A1	17-10-2001
			EP	1214945 A2	19-06-2002
			JP	2003502012 T	21-01-2003